

## Tratamento criogênico para elevar a quantidade de macroporos no Plasma Rico em Fibrina utilizado como *scaffold* em engenharia tecidual

THAIS MAZZETTI<sup>1</sup>; MARCUS CRISTIAN MUNIZ CONDE<sup>2</sup>; SARAH ARANGUREM KARAN<sup>3</sup>; ALISSA SCHMIDT SAN MARTIN<sup>4</sup>; THAÍS GIODA NORONHA<sup>5</sup>; LUIZ ALEXANDRE CHISINI<sup>6</sup>.

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas – thmazzetti@gmail.com

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas – marcusconde82@gmail.com

<sup>3</sup>Universidade Federal de Pelotas – sarahkaram\_7@hotmail.com

<sup>4</sup>Universidade Federal de Pelotas – alissasanmartin@gmail.com

<sup>5</sup>Universidade Federal de Pelotas – thais.gioda.noronha@gmail.com

<sup>6</sup>Universidade Federal de Pelotas – alexandrechisini@gmail.com

### 1. INTRODUÇÃO

*Scaffolds* são estruturas que servem como arcabouço para a adesão e proliferação celular de forma a reproduzir a matriz extracelular das células (DEMARCO et al., 2011). Essas estruturas devem fornecer todas as características físico-químicas necessárias para o crescimento e diferenciação celular formando assim um ambiente tridimensional que possibilite a multiplicação celular e a interação com tecidos circunjacentes (CONDE et al., 2015). Eles podem ser classificados quanto a sua origem, sendo naturais ou sintéticos, com diferentes vantagens entre si. Os naturais por serem originados de estruturas biológicas acabam tendo propriedade biocompatíveis favorecidas e muitas vezes são carregados de moléculas bioativas, os chamados fatores de crescimento. No entanto, são mais difíceis de serem obtidos pois são originados de tecidos vivos. Já os *scaffolds* sintéticos podem ser mais facilmente produzidos, apesar de normalmente não apresentarem comportamentos bioativos (YANG et al., 2001).

A maioria dos *scaffolds* sintéticos são provenientes de polímeros, sendo o *poly-L-lactic acid* (PLLA), *poly-lactic-co-glycolic acid* (PLGA) e hidrogéis (DEMARCO et al., 2011; CAVALCANTI et al., 2013) frequentemente utilizados, contudo não possuem comportamento bioativo. Recentemente materiais biológicos como a fibrina e o colágeno têm sido utilizados como *scaffolds* naturais, devido ao fato de possuírem receptores de superfície que aumentam a compatibilidade celular (KAWASE, 2015; GATTAZZO et al., 2015) além de diversas moléculas bioativas, como interleucinas e fatores de crescimento (TGF- $\beta$ , VEGF, fator de crescimento epitelial - EGF e *insulin-like growth factor I*). Uma forma bastante fácil de se obter a fibrina é a partir da centrifugação sanguínea a uma força de 400 gravidades, descrita por CHOUKROUN et al. (2001). Neste método é formado uma rede de fibrina denominada de Plasma Rico em Fibrina (PRF).

O PRF é um concentrado sanguíneo que tem sido empregado em diversas técnicas de enxertos e regenerações teciduais guiadas, tendo apresentado excelentes resultados. Diversos estudos comprovam que o tamanho e o formato dos poros dos *scaffolds* influenciam no comportamento das células (LIU; MAU 2004; ROOSA et al., 2010; LIEN et al., 2009) além de influenciar na sua

diferenciação (DEMARCO et al., 2010). O cultivo de células em *scaffolds* de PRF tem se mostrado complexo, principalmente no que diz respeito a colonização no interior da rede de fibrina, que apresenta uma elevada quantidade de microporos, podendo dificultar a migração celular no interior destes *scaffolds*. Desta forma, o presente estudo teve como objetivo investigar se a criopreservação do PRF é capaz de aumentar a quantidade de macroporos na rede de fibrina.

## 2. METODOLOGIA

Amostras de sangue foram obtidas a partir de Hemocentro regional de Pelotas – HEMOPEL. Três amostras de sangue foram transferidas para um recipiente de 8ml sem anticoagulante e imediatamente centrifugadas como descrito por CHOUKROUN et al. (2001). Brevemente, cada recipiente foi centrifugado por 10 minutos a uma força gravitacional de 400 para que ocorresse a formação do PRF. Após a centrifugação, os recipientes foram levados a uma capela de fluxo laminar onde foram abertos. Com uma pinça estéril a rede de fibrina foi removida e cortada sutilmente abaixo da região do “*buffy coat*”. Esta região é extremamente importante pois é onde concentra a maior parte das células brancas sanguíneas e plaquetas neste método de centrifugação. Desta forma, a amostra 1 (G=1 controle) foi depositada em formol imediatamente para realização de técnica histológica; a amostra 2 (G=2) foi criopreservada em um ultra freezer (-80°C) por 7 dias; e a amostra 3 (G=3) foi criopreservada em um ultra freezer (-80°C) por um ano. Após o período as amostras foram submetidas a técnica de Hematoxilina e Eosina (H&E) onde foi realizada a microtomia de 3µm de espessura, seguindo da desidratação, diafanização e montagem em Permount® das seções histológicas. Após coloração de H&E, cada lâmina foi levada a um microscópio óptico onde se realizou fotografias digitais (n=10) da rede de fibrina. Três dessas imagens foram randomicamente selecionadas em cada um dos três grupos e através do *Software Image J* foram mensurados os poros da rede de fibrina.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A organização estrutural de um *scaffold* assim como sua porosidade são determinantes na adesão, migração e proliferação celular (DEMARCO et al., 2011). *Scaffolds* com elevada quantidade de macroporos apresentam uma maior colonização e proliferação celular, no entanto, o aumento da porosidade tende a diminuir exponencialmente suas propriedades mecânicas (PEREZ; MESTRES 2015). Em nossos resultados observamos que a criopreservação do PRF aumenta gradativamente o tamanho médio dos poros e consequentemente diminui o número absoluto de poros (tabela1). Desta forma, com a criopreservação do PRF observamos um significativo incremento de macroporos (tabela 2).

Tabela 1. Descrição dos poros da rede de fibrina (em micrômetros) submetidas à criopreservação por diferentes períodos de tempo.

Armazenamento	Número de poros	Área média (DP)	Tamanho mínimo	Tamanho máximo
Nenhum	34024	1.49 (3.60)	0.26	134.98
7 dias	7951	3.32 (14.61)	0.26	608.83
1 Ano	6846	5.10 (18.83)	0.26	707.64

---

\*DP: Desvio Padrão

A colonização inicial de células no interior de *scaffolds* de fibrina é uma tarefa difícil e diversas alternativas vem sendo desenvolvidas para que uma maior quantidade de células consiga se aderir no interior da rede de fibrina (GASSLING et al., 2010). No entanto, essas técnicas destroem totalmente a rede de fibrina formada. No presente estudo, observamos que uma elevação no tamanho de macroporos permeados por uma considerável proporção de microporos. Desta forma, podemos hipotizar que uma maior colonização e migração inicial de células pode ocorrer no interior dessa rede de fibrina.

A influência do tempo de tratamento criogênico parece não ser um fator tão importante, sendo que com 7 dias de tratamento observamos o maior incremento no tamanho de macroporos. Isso se deve principalmente à forma com que o tratamento criogênico ocorre. Quando submetemos substâncias constituídas por H<sub>2</sub>O, como o caso do PRF, à temperaturas abaixo de 4°C, essas substâncias tendem a aumentar o seu volume devido a dilatação anômala da água. Dessa forma, ocorre uma elevação no volume quando resfriadas de 4°C a 0°C, o que causa o rompimento de diversos microporos na rede de fibrina. Desta forma, o tratamento criogênico em fibrinas se mostrou uma opção simples para a aumentar o tamanho dos poros da fibrina, o que pode favorecer a colonização inicial da fibrina utilizada como *scaffold*. No entanto, novas investigações devem ser feitas para testar esta hipótese, além de investigar se a criopreservação não altera as propriedades biológicas dos fatores de crescimento presentes na rede de fibrina.

Tabela 2. Distribuição de macro e microporos na rede de fibrina criopreservadas por diferentes períodos de tempo

Armazenamento	Microporos (%)	Macroporos (%)
Nenhum	35.89	64.11
7 dias	23.61	76.39
1 Ano	17.21	82.79

Macroporos ≥ 50 µm; microporos < 50 µm

#### 4. CONCLUSÕES

A criopreservação do PRF proporciona uma elevação na quantidade de macroporos na rede de fibrina, o que pode vir a favorecer a migração e colonização inicial de *scaffolds* desenvolvidos com PRF. No entanto, os resultados devem ser interpretados com cautela e investigações devem ser dirigidas para investigar possíveis alterações advindas da criopreservação nas biomoléculas presentes no PRF.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CAVALCANTI BN, ZEITLIN BD, NOR JE. A hydrogel scaffold that maintains viability and supports differentiation of dental pulp stem cells. **Dental Materials**. Tokyo, v.29, n.1, p. 97-102, 2013.

CHOUKROUN J, ADDA F, SCHOEFFLER C, VERVELLE A. Une opportunité en paro-implantologie: le PRF. **Implantodontie**. França, v.42, p 55-62, 2001.

CONDE MC, CHISINI LA, DEMARCO FF, NOR JE, CASAGRANDE L, TARQUINIO SB. Stem cell-based pulp tissue engineering: variables enrolled in translation from the bench to the bedside, a systematic review of literature. **International Endodontic Journal**. England, v.49, n.6, p. 543-550, 2015.

DEMARCO FF, CASAGRANDE L, ZHANG Z, DONG Z, TARQUINIO SB, ZEITLIN BD, SHI S, SMITH AJ, NÖR JE. Effects of morphogen and scaffold porogen on the differentiation of dental pulp stem cells. **Journal of endodontics**. New York, v.36, n.11, p. 1805-1811, 2010.

DEMARCO FF, CONDE MC, CAVALCANTI BN, CASAGRANDE L, SAKAI VT, NOR JE. Dental pulp tissue engineering. **Brazilian Dental Journal**. Ribeirão Preto, v.22, n.1, p. 3-13, 2011.

GASSLING V, DOUGLAS T, WARNKE PH, ACIL Y, WILTFANG J, BECKER ST. Platelet - rich fibrin membranes as scaffolds for periosteal tissue engineering. **Clinical oral implants research**, Denmark, v.21, p. 543-549, 2010.

GATTAZZO F, URCIUOLO A, BONALDO P. Extracellular matrix: a dynamic microenvironment for stem cell niche. **Biochimica et Biophysica Acta**. Netherlands, v.1840, n.8, p. 2506-2519, 2014.

KAWASE T. Platelet-rich plasma and its derivatives as promising bioactive materials for regenerative medicine: basic principles and concepts underlying recent advances. **Odontology**, v.103, n.2, p.126-135, 2015.

LIEN SM, KO LY, HUANG TJ. Effect of pore size on ECM secretion and cell growth in gelatin scaffold for articular cartilage tissue engineering. **Acta Biomaterialia**. England, v.5, n.2, p. 670-679, 2009.

LIU X, MAU PX. Polymeric Scaffolds for Bone Tissue Engineering. **Annals of Biomedical Engineering**. Netherlands, v.32, n.3, p. 477-486, 2004.

PEREZ RA, MESTRES G. Role of pore size and morphology in musculo-skeletal tissue regeneration. **Materials Science and Engineering C: Materials for Biological Applications**. Amsterdam, v.61, p. 922-939, 2016.

ROOSA SM, KEMPPAINEN JM, MOFFITT EN, KREBSBACH PH, HOLLISTER SJ. The pore size of polycaprolactone scaffolds has limited influence on bone regeneration in an in vivo model. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**. United States, v.92, p. 359–368, 2010.

YANG S, LEONG KF, DU Z, CHUA CK. The design of scaffolds for use in tissue engineering. Part I. Traditional factors. **Tissue Engineering**. United States, v.7, n.6, p. 679-689, 2001.